

## ヘムタンパク質の磁気円偏光二色性に関する研究

著者	山本 高夫
号	626
発行年	1979
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/24187">http://hdl.handle.net/10097/24187</a>

氏名・（本籍）	やま      もと      たか      お 山      本      高      夫
学位の種類	理      学      博      士
学位記番号	理博第    6 2 6    号
学位授与年月日	昭和 5 4 年    3 月 2 7 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科・専攻	東北大学大学院理学研究科 （博士課程） 化学第 2 専攻
学位論文題目	ヘムタンパク質の磁気円偏光二色性に関する研究
論文審査委員	（主査） 教      授      旗      野      昌      弘      教      授      斎      藤      一      夫 教      助      教      伊      藤      光      男      教      授      岩      泉      正      基 野      沢      庸      則

## 論      文      目      次

- 第 1 章 序 論
- 第 2 章 磁気円偏光二色性の理論
- 第 3 章 鉄(III)低スピンヘム錯体の磁気円偏光二色性
- 第 4 章 鉄(III)高スピンヘム錯体の磁気円偏光二色性
- 第 5 章 鉄(III)ヘム錯体の吸収帯の移動
- 第 6 章 鉄(II)低スピンヘム錯体の磁気円偏光二色性
- 第 7 章 総 括

# 論文内容要旨

## 第1章 序 論

ヘムタンパク質の中でミオグロビンやヘモグロビンは、比較的容易に、しかも多量に入手でき、また人間をはじめとする高等動物の呼吸作用において重要な役割を果たしているために、古くから様々な手段、方法によってヘム近傍の構造やヘムの電子状態が研究されて来た。

生化学的には、X線回折で明らかにされたタンパク質の立体構造を手がかりにして、ヘモグロビンが示すアロステリック効果を解明する研究が理論、実験両面からつづけられている。物理化学的には、ヘム周辺の電子状態や立体構造について、ESR、共鳴ラマン効果、NMR、メスバウアー効果等のスペクトルを用いて解析されて来た。また、最近、ポルフィリン、金属、配位子を含めた半経験的および非経験的分子軌道計算によって、ヘムの電子状態が解析されている。しかし、酸素化過程、酸素結合の立体配置、酸素・鉄イオン間の結合などについては、いまだに重要な問題が残されている。

吸収スペクトルや磁気円偏光二色性スペクトルによる研究は、主として可視部領域に限られていた。可視部領域の遷移は、ポルフィリンの $\pi-\pi^*$ 遷移に基づくものであるが、理論的な計算から近赤外部領域(700~2000 nm,  $14000\sim5000\text{cm}^{-1}$ )に鉄イオンの関与したd-d遷移、電荷移動遷移が期待されており、この波長領域のスペクトルに鉄イオンの電子状態が、可視部領域の吸収よりも直接反映するものと考えられる。

そこで当研究室において試作された近赤外部領域の円偏光二色性の測定可能な分光器を用い、種々のミオグロビン、ヘモグロビン錯体の近赤外部領域の磁気円偏光二色性スペクトルを測定したこれらの近赤外部領域の磁気円偏光二色性スペクトルは、本研究において始めて観測されたものである。

本論文では、鉄(II)低スピンおよび鉄(III)高スピン錯体が近赤外部領域に示した吸収、磁気円偏光二色性スペクトルの帰属、吸収極大位置の移動の特徴を配位子場理論に基づいて解析した。さらに鉄(II)低スピン錯体の吸収、磁気円偏光二色性スペクトルについても理論的説明を試みた。以上の研究成果は、ミオグロビンのみでなく、多くのヘムタンパク質の電子状態の解析に磁気円偏光二色性スペクトルが有効であることを明らかにした。

## 第2章 磁気円偏光二色性の理論

本章では、以下の章で用いる磁気円偏光二色性の理論について概要を述べた。

### 第3章 鉄(II)低スピンヘム錯体の磁気円偏光二色性

シアノメトミオグロビン、メトミオグロビンイミダゾール、アジドメトミオグロビンは、それぞれ吸収スペクトルに類似した正の磁気円偏光二色性スペクトルを近赤外部領域に示した。配位子が異なる場合でも吸収位置、スペクトルの形が互いに非常によく似ていることより、近赤外部領域の吸収は、低スピン鉄(II)イオンに関与した遷移と考えられる。ミオグロビンの単結晶の偏光スペクトルより、これらの吸収帯はポルフィリン面内に分極していることが知られており、そのような遷移としては、 $C_4$  対称性のもとでのポルフィリンの  $a_1$ ,  $a_2$  軌道から鉄イオンの  $e$  軌道への電荷移動遷移が考えられる。また、鉄(II)低スピンの代表であるシアノメトミオグロビンの吸収、磁気円偏光二色性スペクトルの温度依存性の実験より、近赤外部領域の磁気円偏光二色性の Faraday 項は、強度が  $1/T$  に比例する  $C$  項であることが明らかとなった。そこで、上述の帰属に従った時、Faraday の  $C$  項が支配的であるという実験結果を説明できるかということについて、ヘム鉄イオンまわりの実効対称性を  $C_4$  と仮定し、理論的考察を行なった。基底状態の波動関数として ESR の実験より知られている  $g$  値を再現するようにスピン軌道相互作用を考慮した波動関数を用いた。このようにして得られる波動関数は一般に

$$\psi_k^{\pm} = \mp A \xi^{\pm} + B \eta^{\pm} + C \zeta^{\mp} \quad (+, - \text{は } \alpha, \beta \text{ スピンを示す})$$

の形をしており、クラマースの 2 重項を形成している。磁気円偏光二色性の理論式より、最低エネルギーのクラマース 2 重項の係数  $A_1$ ,  $B_1$ ,  $C_1$  を用いて  $C$  項の大きさを見つめることができる。 $C$  項は

$$C = -3 [(A_1 + B_1)^2 - C_1^2] A_1 B_1 \langle a_1 | m_x | \eta \rangle \langle \xi | m_y | a_1 \rangle$$

となり、 $B$  項、 $A$  項についても同様に求められる。波形関数をガウス型関数と仮定して、各 Faraday 項の  $[\theta]_M^{\max}$  の比を求め、各項の  $[\theta]_M$  への寄与を見積ると、Faraday の  $C$  項が支配的であるという結果が得られた。

したがって、近赤外部領域の鉄(II)低スピン錯体の磁気円偏光二色性および吸収スペクトルは、ポルフィリンから鉄イオンへの電荷移動遷移に基づくものであることが明らかとなった。<sup>1</sup>

### 第4章 鉄(III)高スピンヘム錯体の磁気円偏光二色性

鉄(III)高スピン錯体(ヒドロキソメトミオグロビン、フルオロメトミオグロビン、アクアメトミオグロビン)は、低スピン錯体とは異なるが、高スピン錯体に共通したスペクトルを示した。すなわち、最長波長側の吸収極大に対応して、分散型の磁気円偏光二色性スペクトルを示している。フルオロメトミオグロビンの吸収および磁気円偏光二色性スペクトルの温度依存性より、Faraday 項は、主に  $A$  項(または、一対の符号の異なった  $B$  項)であり、それに小さな  $C$  項が重なっていることがわかった。

この領域の吸収帯は、鉄(III)低スピンの場合と同様に、ポルフィリンの  $a_1$ ,  $a_2$  軌道から鉄イオン

の  $e$  軌道への電荷移動遷移と考えられる。 $C_4$  対称近似のもとでは、基底状態が $^6A_1$ 、励起状態が $^6E$ となるので、 $A$ 項が現われることが当然期待されるが、定量的に $A$ 項が支配的になるかについて、Faraday パラメーターの見積りを配位子場理論に基づいて行なった。スピン軌道相互作用によって分裂した6つの状態への基底状態からの遷移を考慮すると、 $A$ 項は6つの遷移すべてに対して同符号をとるが、 $C$ 項は反対符号をとるものが半分ずつあり、結果として $A$ 項と $C$ 項からの $[\theta]_M$ への寄与は、ほぼ同程度となる。この結論は、実験から得た $A$ 項（または2つの $B$ 項）と $C$ 項が重なっているという結論と一致し、近赤外部領域の鉄(III)高スピン錯体の長波長側の吸収ピークは、ポルフィリンの $u_1$ 、 $u_2$ 軌道から鉄イオンの $e$ 軌道への遷移に基づいていることが明らかになった。

## 第5章 鉄(III)ヘム錯体の吸収帯の移動

鉄(III)高スピン、および鉄(III)低スピンヘム錯体が、それぞれのグループ内で示した電荷移動遷移による吸収帯の位置は、配位子の違いによって、約 $6,000\text{ cm}^{-1}$ の範囲に広がっている。

本章では、この点について配位子場理論に基づいて考察した。電荷移動遷移による吸収帯の位置は、エネルギーの低い方から順に軸配位子で表わすと、低スピン錯体では、 $\text{CN}^-$ 、 $\text{Im}$ 、 $\text{N}_3^-$ 、 $\text{O}^{2-}\text{H}^-$ となっている。配位子と鉄イオンの静電的相互作用パラメーター $\Pi_x$ 、 $\Pi_y$ を用いて、この移動は、鉄イオンの $e$ 軌道のエネルギーが配位子の種類によって変化することに原因があることを明らかにした。 $\Pi_x$ 、 $\Pi_y$ の値としては、 $\text{CO(III)X}_6$ 型錯体と $\text{CO(III)X}_4\text{YZ}$ 型錯体の吸収スペクトルから求められている山寺、Jørgensenらの値を用いた。

## 第6章 鉄(II)低スピンヘム錯体の磁気円偏光二色性

一酸化炭素ミオグロビン、一酸化窒素ミオグロビン、酸素ミオグロビンは、鉄(II)低スピン錯体であるが、一酸化炭素ミオグロビンと酸素ミオグロビンにおいて、メスバウアースペクトルに違いが見られることなどから、ヘムの電子状態に何らかの違いがあると考えられる。一酸化炭素ミオグロビンと酸素ミオグロビンは、反磁性であるため磁氣的測定からの情報は期待できない。幾種類かのヘモグロビン、ミオグロビンの一酸化炭素、一酸化窒素、酸素錯体について磁気円偏光二色性を測定した結果、近外部領域で顕著な差が見出された。

すなわち、一酸化炭素ミオグロビンは、吸収および磁気円偏光二色性スペクトルを全く示さず、酸素ミオグロビンは、 $8,500 \sim 14,000\text{ cm}^{-1}$ にわたって、低数値側より正、負の磁気円偏光二色性スペクトルを示した。一酸化窒素ミオグロビンでは、 $12,700\text{ cm}^{-1}$ 付近に正の磁気円偏光二色性スペクトルが観測された。第5配位子の電子状態に対する考察から、これらの吸収は、ポルフィリンまたは、鉄イオンから酸素分子、一酸化窒素への電荷移動遷移によるものと考えた。

可視部領域では、3種の錯体のSoret帯領域とQ帯領域の磁気円偏光二色性スペクトルの強度に大きな違いが観測された。磁気円偏光二色性スペクトルよりモーメント法によって $A'/D$ の値を算

出すると、 $A'/D$ の大きさは、Soret 帯領域において大きい方から順に一酸化炭素錯体>酸素錯体>一酸化窒素錯体となっている。この違いは、ポルフィリンの窒素の鉄イオンへの配位状態が第 6 配位子によって違っていることを反映していると仮定し、主としてポルフィリンの  $\pi$  電子系の  $\pi \rightarrow \pi^*$  遷移である Soret 帯、Q 帯の磁気円偏光二色性強度を理論的に求めた。

計算は、ポルフィリンの  $\pi$  系についてのみ Pariser—Parr—Pople 法に従って行なった。その際ポルフィリンの窒素上の孤立電子対の鉄イオンへの電子供与の差をポルフィリンの窒素の芯 (コア) 荷電を変えることによって取り入れた。その結果実験結果と対応した磁気円偏光二色性スペクトルの変化が再現された。ピロール環の N—C 結合次数の変化は、共鳴ラマンスペクトルにあらわれる N—C 結合の性質に主として依存する band IV の変化の傾向と一致した。

## 第 7 章 総 括

本章では、本研究によって得られた結果を総括し、あわせて今後の展望を述べた。

## 論文審査の結果の要旨

生命活動においてヘムタンパク質の果す役割りは極めて重要である。動物の呼吸と関連したヘモグロビンやミオグロビン、生物の代謝に関連するチトクロムP-450やトリプトファンピロラーゼ、生物中のエネルギー変換に関連する電子伝達系のチトクロム類等、ヘムタンパク質の種類も多く、又その生化学的重要性も大きい。

山本高夫提出の論文は「ヘムタンパク質の磁気円偏光二色性に関する研究」である。

まず、第一章の序論では生物の生命活動におけるヘムタンパク質の重要性を論じた後、ヘムタンパク質中のヘム周辺の構造解析に用いられてきた種々の分光学的手段について従来の研究がどの様に進められてきたかを論じている。これらの分光学的手段はヘムの電子状態の解析に有効であるが特に磁気円偏光二色性分光法はヘムの電子状態の解析に不可欠であることを強調している。この立場に立ち、本研究でとりあげたヘムの磁気円偏光二色性分光学によりどのような知見がえられるかを論ずると共に、本論文の構成についてのべている。

第2章では本研究に用いられた磁気円偏光二色性分光学の基礎的理論をのべ、観測される磁気円偏光二色性スペクトルより Faraday パラメーターを評価する方法について詳述している。

第3章では鉄(Ⅱ)低スピン錯体の磁気円偏光二色性スペクトルの測定結果と理論的考察についてのべている。本研究により従来にない新しい近赤外部領域円偏光二色性分光計が製作された。鉄(Ⅱ)低スピン錯体に分類できるシアノメトミオグロビン、メトミオグロビンイミダゾール、アジドメトミオグロビンはそれぞれ吸収スペクトルに類似した正の磁気円偏光二色性スペクトルを近赤外部領域に示した。このスペクトルはポルフィリンの  $a_1$ ,  $a_2$  軌道から鉄イオンの  $e$  軌道への電荷移動遷移と帰属された。この帰属はこのスペクトルの温度依存性の測定結果からも支持される。 $C_4$  対称を仮定し、スピン軌道相互作用を考慮して、波動関数を求め、各 Faraday 項を求め、実験結果との対比を行ない、上述の帰属の妥当性を示している。

第4章では鉄(Ⅲ)高スピン錯体の磁気円偏光二色性スペクトルの測定結果と理論的考察についてのべている。鉄(Ⅲ)高スピンヘム錯体に分類できるヒドロキシメトミオグロビン、フルオロメトミオグロビン、アクアメトミオグロビンは近赤外部領域の吸収極大に対応して分散型の磁気円偏光二色性スペクトルを示している。この領域の吸収帯は鉄(Ⅱ)低スピンヘム錯体の場合と同様にポルフィリンの  $a_1$ ,  $a_2$  軌道から鉄イオンの  $e$  軌道への電荷移動遷移と帰属された。

第5章では第3章及び第4章にのべられた種々の軸配位子をもつ鉄(Ⅲ)ヘム錯体の電荷移動遷移による各吸収帯の波長シフトの原因を論じている。配位子と鉄イオンとの間の静電的相互作用パラメーターを用い、この吸収帯の波長シフトは鉄イオンの  $e$  軌道のエネルギーが配位子の種類によって変化することに起因していることを明らかにした。

第6章では鉄(Ⅱ)低スピンヘム錯体の磁気円偏光二色性スペクトルの測定結果とその理論的考察を

のべている。軸配位子がCO, O<sub>2</sub>, NOである場合にSoret及びQ帯領域の磁気円偏光二色性スペクトルの強度はそれぞれ異なる。これらが反磁性であることからポルフィリンの系についてののみ着目し, Pariser-Parr-Pople法近似で分子軌道を求め, 実験結果との対応を検討した。その結果, ヘムへの軸配位子からの電子供与により, ポルフィリンの窒素原子のコア荷電が変化したことにより, 磁気円偏光二色性の強度が変化したものであると推論している。

本研究はヘムタンパク質の代表例としてミオグロビンをとりあげ, 軸配位子の配位子場を鋭敏に反映する遷移が近赤外部領域にあらわれることを見出した優れた研究である。測定された結果について従来の研究結果をふまえ詳細な理論的考察を試みている。この山本高夫提出の論文はヘムタンパク質の構造と機能との関連を明らかにする手がかりを提示した研究である。

山本高夫提出の論文は山本高夫が自立して研究活動を行なうに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。

よって, 山本高夫提出の論文は, 理学博士の学位論文として合格と認める。